

Dinamičko mehanička svojstva PCL/fibroin svile elektroispredenih nosača za regeneraciju oka

Milčić, Ela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:472736>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ela Milčić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ela Milčić

**DINAMIČKO MEHANIČKA SVOJSTVA PCL/FIBROIN SVILE
ELEKTROISPREDENIH NOSAČA ZA REGENERACIJU OKA
DIPLOMSKI RAD**

Voditelj rada: Prof.dr.sc. Emi Govorčin Bajsić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof.dr.sc. Emi Govorčin Bajsić

Prof.dr.sc. Zlata Hrnjak-Murgić

Prof.dr.sc. Veljko Filipan

Zagreb, rujan 2019.

ZAHVALA

Mentorici prof.dr.sc. Emi Govorčin Bajsić zahvaljujem se na njenoj pristupačnosti, pomoći i savjetima tokom izrade ovog rada, kao i na svom znanju koje sam stekla na njenim zanimljivim i poučnim predavanjima.

Mag.ing.oecoiing. Nikolini Mrkonjić hvala na pomoći i ugodnoj atmosferi prilikom izrade eksperimentalnog dijela.

Zahvaljujem se dr.sc. Budimiru Mijoviću i dr.sc.Emiliji Zdravevi s Tekstilno-tehnološkog fakulteta na ustupanju njihovog laboratorija. Posebno hvala dr.sc.Zdravevi na njenoj ljubaznosti i savjetima tijekom izrade uzoraka.

Od srca hvala mom bratu Vladimiru te roditeljima Vesni i Goranu na bezuvjetnoj podršci i strpljenju, bez vas i vaše vjere u mene ovo ne bi bilo moguće.

Mom Stjepanu hvala što je uvijek uz mene, što me motivira i potiče da budem svoja i uvijek dam sve od sebe.

*Svim **mojim prijateljima** najljepša hvala na njihovom vremenu, iskustvima koje smo stekli zajedno te uspomenama kojih ću se uvijek rado sjećati.*

Hvala svima!

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Postupak elektroispredanja proveden je na Zavodu za temeljne prirodne i tehničke znanosti, Laboratorij za elektroispredanje, na Tekstilno-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

Tema rada dio je područja istraživanja koje se provodi u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta "Ciljana izrada prototipa vlaknastog nosača za uzgoj tkivnih stanica kombiniranimelektroispredanjem–COMBOELECTROSPUN",IP-2016-06-6878, financiran od Hrvatske zaklade za znanost.

SAŽETAK

Brojna istraživanja te nova saznanja o materijalima i njihovoj biokompatibilnosti s tkivima potaknula su razvoj tkivnog inženjerstva, što je posljedično dovelo do napretka u regenerativnoj medicini i liječenju pacijenata. Svrha tkivnog inženjerstva je obnova građe i funkcije oštećenih i bolesnih tkiva te olakšanje procesa liječenja za pacijente. Biomaterijali koji se pritom koriste trebaju biti biokompatibilni, biorazgradljivi i netoksični. Fibroin svile je materijal koji se dugi niz godina koristi u biomedicini i pokazuje brojna pozitivna svojstva kao što su dobra mehanička svojstva, biokompatibilnost i biorazgradljivost.

Cilj ovog rada je priprema elektroispredenih nosača na osnovi polikaprolaktona (PCL) i različitih udjela fibroina svile (FS) postupkom elektroispredanja. Ispitan je utjecaj FS na strukturu, dinamičko-mehanička svojstva te toplinska svojstva elektroispredenih nosača pomoću infracrvene spektroskopije (FTIR-ATR), dinamičko mehaničke analize (DMA) i termogravimetrijske analize (TGA). Uzorci su podvrgnuti i određivanju mehaničkih svojstava pomoću kidalice.

Dobiveni rezultati DMA analize pokazuju da porastom udjela FS dolazi do smanjenja vrijednosti modula gubitka, E'' te povećanja vrijednosti staklišta, T_g . Toplinska stabilnost elektroispredenih nosača određena TGA analizom smanjuje se porastom udjela FS. Dobiveni FTIR spektri pokazuju da je FS uspješno ugrađen u elektroispredeni PCL vlaknasti nosač. Mjerenje mehaničkih svojstava pokazuje da se prekidna čvrstoća smanjuje porastom udjela FS u elektroispredanim nosačima.

Ključne riječi: biomaterijali, tkivno inženjerstvo, elektroispredanje, polikaprolakton, fibroin svile

ABSTRACT

Many investigations and new findings about materials and their compatibility with tissues have initiated tissue engineering growth. Consequently, that led to progress in regenerative medicine and patients recovery. Main purpose of tissue engineering is to restore damaged and diseased tissues and to ease a healing process for patients. Biomaterials used in tissue engineering should be biocompatible, biodegradable and non-toxic. Silk fibroin is a material that has been used in biomedicine for many years and it shows many positive properties such as mechanical properties, biocompatibility and biodegradability.

The aim of this work is to prepare electrospun scaffolds based on polycaprolactone (PCL) and different silk fibroin (SF) content by electrospinning. The effect of SF on the structure, dynamicmechanical properties and thermal properties of electrospun scaffolds were investigated by infrared spectroscopy (FTIR-ATR), dynamic-mechanical analysis (DMA) and thermogravimetric analysis (TGA). The mechanical properties were also determined using a testing machine.

Results obtained with DMA showed that with addition of silk fibroin, the loss modulus, E'' decreases and the glass transition temperature, T_g increases. Thermal stability of electrospun scaffolds determined by TGA decreases with the addition of silk fibroin. The FTIR results showed that the silk fibroin was successfully introduced to PCL scaffolds. Mechanical properties showed that the tensile strength decreases with increasing SF content in electrospun scaffolds.

Key words: biomaterials, tissue engineering, electrospinning, polycaprolactone, silk fibroin

SADRŽAJ

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. BIOPOLIMERI	2
2.2. SVILA.....	3
2.2.1. Struktura fibroina svile.....	3
2.2.2. Svojstva fibroina svile	5
2.2.2.1. Mehanička svojstva svile	5
2.2.2.2. Biokompatibilnost	6
2.2.2.3. Biorazgradnja.....	6
2.2.2.4. Prerada fibroina svile na bazi vode.....	7
2.2.3. Primjena svile u biomedicini.....	7
2.3. POLIKAPROLAKTON (PCL)	8
2.4. TKIVNO INŽENJERSTVO.....	9
2.4.1. Nosači za tkivno inženjerstvo.....	11
2.4.2. Primjena nanovlakana	11
2.4.3. Regeneracija očnog tkiva	12
2.5. ELEKTROISPREDANJE	14
2.5.1. Polimeri koji se koriste za elektroispredanje.....	15
2.5.2. Proces elektroispredanja.....	15
2.5.3. Parametri elektroispredanja.....	17
2.6. DINAMIČKO MEHANIČKA SVOJSTVA	19
2.6.1. Dinamičko mehanička analiza (DMA)	19
3.EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. Materijali.....	20
3.2. Priprema polimernih otopina.....	20
3.3. Postupak elektroispredanja.....	21
3.4. Tehnike karakterizacije	22
3.4.1. Dinamičko mehanička analiza (DMA)	22
3.4.2. Termogravimetrijska analiza (TGA).....	23
3.4.3. Infracrvena spektroskopija FKIR-ATR.....	24
3.4.4. Mehanička svojstva materijala	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26

4.1. Dinamičko mehanička analiza (DMA)	26
4.2. Termogravimetrijska analiza (TGA).....	28
4.3. Infracrvena spektroskopija FTIR-ATR	32
4.4. Mehanička svojstva.....	35
5. ZAKLJUČAK.....	37
6. LITERATURA	38
7. ŽIVOTOPIS.....	41

1.UVOD

Bolesti ili traume mogu drastično smanjiti kvalitetu života i uzrokovati oštećenja tkiva koja se klasičnim liječenjem ne mogu popraviti. Nedostatak terapijske učinkovitosti posljedica je činjenice da su trenutna liječenja usmjerena samo na sprječavanje ili smanjenje daljnjeg oštećenja tkiva, umjesto da doprinose popravku ili regeneraciji tkiva. Cilj regenerativne medicine je obnoviti ili zamijeniti oštećeno ili bolesno tkivo zdravim, funkcionalnim tkivom.¹ Tkivno inženjerstvo je multidisciplinarno područje u kojem se kombiniraju načela inženjerstva i znanosti u svrhu razvoja bioloških supstituta te obnove, očuvanja ili poboljšanja funkcionalnosti tkiva. Istraživanje biomaterijala ima ključnu ulogu u tkivnom inženjerstvu jer biomaterijali služe kao matrice za stanični rast, proliferaciju i formiranje novog tkiva u tri dimenzije.² Polikaprolakton (PCL) je semikristalan poliestar s izvrsnom topljivošću u organskim otapalima i niskom vlačnom čvrstoćom. Ima visoke vrijednosti istezanja, malu brzinu razgradnje *in vivo*, visoku toplinsku stabilnost te visoku temperaturu razgradnje. PCL i njegovi kompoziti koriste se za izradu nosača u tkivnom inženjerstvu koje omogućavaju regeneraciju kosti, ligamenata, hrskavica, kože, živaca i vaskularnog tkiva.³ Fibroin svile (FS) je vlaknasti protein koji ima jedinstvena mehanička svojstva, prilagodljivu brzinu razgradnje i mogućnost podržavanja diferencijacije stanica što ga čini povoljnim materijalom za izradu nosača u tkivnom inženjerstvu.⁴ Elektroispredanje je jednostavna metoda proizvodnje finih vlakana, čiji je promjer u području nano i mikrometara, a površina željene morfologije. Primjenom jakog električnog polja na polimernu otopinu ili taljevinu dolazi do nastanka vlakana.⁵

Svrha ovog rada je priprema elektroispredanih nosača na osnovi polikaprolaktona (PCL) i fibroina svile (FS) postupkom elektroispredanja. Udjeli fibroina svile korišteni za izradu nosača iznose 10%, 30% te 50 mas. %. Ispitan je utjecaj fibroina svile na dinamičko mehanička svojstva elektroispredanih PCL/FS vlaknastih nosača dinamičko mehaničkom analizom (DMA). Izmjerena su i mehanička svojstva testom rasteznog naprežanja upotrebom mehaničke kidalice. Određene su promjene u strukturi te toplinska stabilnost primjenom infracrvene spektroskopije (FT-IR) i termogravimetrijskom analizom (TGA).

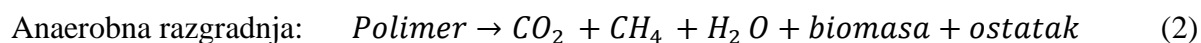
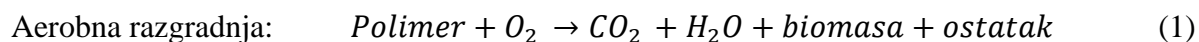
2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOPOLIMERI

Biopolimeri su polimerne biomolekule kod kojih su monomerne jedinice kovalentnim vezama povezane u veće molekule. Prefiks „bio“ znači da su to biorazgradljivi materijali proizvedeni od živih organizama. Pojam biopolimeri opisuje materijale dobivene iz bioloških izvora kao što su mikroorganizmi, biljke i drveće te materijale proizvedene sintetski iz bioloških izvora poput biljnih ulja, šećera, masti, smola, proteina, aminokiselina, itd. Prema ponavljajućoj jedinici dijele se u tri skupine:

1. Polisaharide građene od šećera (npr. celuloza u biljkama)
2. Proteine građene od aminokiselina (npr. mioglobin u mišićnom tkivu)
3. Nukleinske kiseline građene od nukleotida (npr. DNA, genetski materijal živih organizama)

Glavno svojstvo po kojem se biopolimeri razlikuju od sintetskih polimera dobivenih iz fosilnih goriva je njihova održivost, pogotovo u kombinaciji s biorazgradljivošću. Biorazgradnja je kemijska razgradnja materijala izazvana mikroorganizmima kao što su bakterije, gljivice i alge. Kod biorazgradnje bitni faktori su temperatura i pH. Ovaj proces dijeli se na (1) aerobnu i (2) anaerobnu razgradnju.



Ako je prisutan kisik odvija se aerobna razgradnja i proizvodi se ugljikov dioksid. Bez prisutnosti kisika odvija se anaeroba razgradnja i proizvodi se metan. Kemijska struktura (odgovorna za stabilnost funkcionalnih skupina, reaktivnost, hidrofilnost te bubrenje) je najvažniji čimbenik koji utječe na biorazgradnju polimernih materijala. Ostali bitni čimbenici su između ostalog i fizikalna te fizikalno-mehanička svojstva npr. molekulska masa, poroznost, elastičnost i morfologija. Zbog biokompatibilnosti i biorazgradnje biopolimeri imaju široku primjenu. Koriste se za sintezu nanomaterijala, u medicini, industriji hrane, kao ambalažni materijali, za pročišćavanje vode itd.⁶

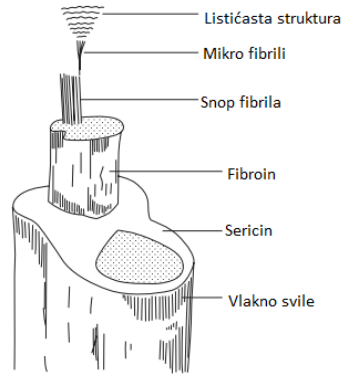
2.2. SVILA

Svila pripada skupini organskih polimera visoke molekulske mase za koje su karakteristične ponavljajuće hidrofobne i hidrofilne peptidne sekvence. Svile su fibrozni proteinski polimeri koje člankonošci poput svilca, pauka, škorpiona itd. ispredaju u vlakna. Ovisno o njihovom specifičnom izvoru i funkciji svile imaju različit sastav, strukturu i svojstva.⁷ Iako mnogi insekti proizvode svilu, samo se ona vlakna proizvedena od dudovog svilca, *Bombyx mori* i nekoliko drugih insekata istog roda koriste u industriji svile. Svila dobivena od drugih insekata, uglavnom pauka koristi se u malim količinama za oružje i optičke instrumente. Vrlo je cijenjena kao tekstilno vlakno. Njena čvrstoća, elastičnost, mekoća, apsorpcija, afinitet za boje te prilagodljivost različitim oblicima uvijanja zadovoljavaju razne zahtjeve tržišta. Unatoč oštroj konkurenciji koju predstavljaju sintetska vlakna svila je zadržala prioritet u proizvodnji luksuzne odjeće i specijaliziranih proizvoda visoke kvalitete.

Svilarstvo je i umjetnost i znanost u smislu uzgoja svilca za proizvodnju svile. Svilu kao nosivo vlakno otkrila je kineska carica Xi Ling Shi oko 2640. p.n.e.⁸ Razvila je proces sakupljanja vlakana svile plutanjem čahura na toploj vodi. Taj proces i svilac monopolizirani su od Kine sve do 550. godine nove ere. Tada su dva misionara prokrijumčarili jajašca svilca i sjeme dudu iz Kine u Carigrad (Istanbul). Prvo rezervirana za upotrebu od strane kineskih careva, naposljetku se njena upotreba raširila do Bliskog Istoka, Europe i Sjeverne Amerike, a danas se upotrebljava diljem svijeta.⁹

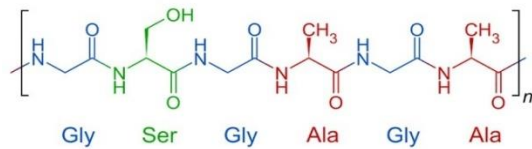
2.2.1. Struktura fibroina svile

Svila se sastoji od dva proteina: fibroina (70%-80%) i sericina (20%-30%). Struktura je prikazana na *slici 1*. Fibroin svile je prirodan fibrozni protein semikristalne strukture, koja osigurava krutost i čvrstoću. Sericin je amorfan proteinski polimer koji djeluje kao adhezivno vezivo kako bi se održao strukturni integritet vlakana i čahure. Sericin je u pravilu topljiv što omogućava njegovo lako uklanjanje iz *B. mori* čahure koristeći termo-kemijski proces znan kao degumiranje u tekstilnoj industriji. Količina sericina između vlakana fibroina u velikoj mjeri utječe na svojstva čahure.¹⁰



Slika 1. *Struktura svile*⁷

Struktura fibroina svile (FS) je 30-ih godina 20. stoljeća preliminarno proučavana analitičkim i biokemijskim metodama. 50-ih godina dolazi do velikog napretka u istraživanju strukture fibroina svile. Razvoj raznih tehnika karakterizacije kao što su Raman, rendgenska mikroskopija, rendgenska difrakcija, nuklearna magnetska rezonancija (NMR) omogućio je bolje razumijevanje strukture fibroina svile. Fibroin svile sadrži 18 aminokiselina. Gotovo 80% od ukupne količine aminokiselina čine glicin (Gly), alanin (Ala) i serin (Ser), prikazano na *slici 2*. Niz aminokiselina u fibroinu svile sadrži ponavljajuće Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser (GAGAGS) sekvence, koje se udružuju u antiparalelne β -pločaste strukture.



Slika 2. *Struktura fibroina svile*

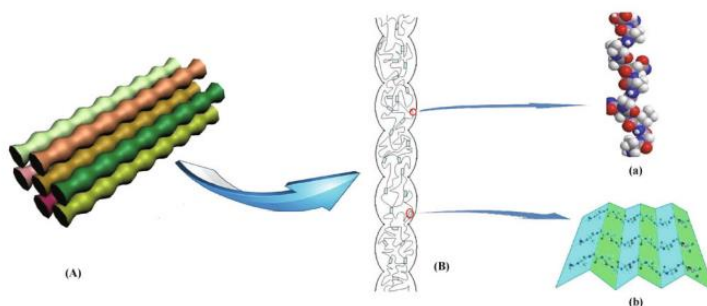
Fibroin svile može se pojaviti u četiri različite strukture: svila I, svila II, svila III te u obliku klupka. Svila I osigurava dobru topljivost u vodi jer se sastoji od α -spirala i β -ploča. Svila II je bogata β -pločama i pruža otpor prema topljivosti u vodi. Glavna je strukturna konfiguracija u fibroinu svile te zbog nje fibroin svile pokazuje dobra mehanička svojstva i fiziokemijska svojstva. Svila III ima strukturu trostruke spirale i teško je topljiva. Struktura nasumičnog klupka uglavnom postoji u otopini fibroina svile. Četiri navedene strukture se pod odgovarajućim uvjetima mogu transformirati jedna u drugu.¹¹

2.2.2. Svojstva fibroina svile

Vlakna svile imaju poboljšanju stabilnost pri atmosferskim uvjetima u odnosu na globularne proteine zbog vodikovih veza, hidrofobne prirode većeg dijela proteina te značajne kristalnosti. Svila je netopljiva u većini otapala, uključujući vodu, razrijeđene kiseline i alkalije.¹²

2.2.2.1. Mehanička svojstva svile

Fibroin svile je prikladan za tkivno inženjerstvo, uzimajući u obzir njegova mehanička svojstva i fizikalno-kemijska svojstva. Sastav i struktura svile određuju njena mehanička i fizikalno-kemijska svojstva. Faktori koji određuju mehanička svojstva svile su precizna kontrola veličine, broj, raspodjela, orijentacija i prostorni raspored fibroina i sericina. Svila pokazuje izvanrednu kombinaciju čvrstoće i žilavosti. Svila pruža ravnotežu između modula, čvrstoće i istezanja, što doprinosi njenoj žilavosti i duktilnosti. Mehanička svojstva svile dobivene od *B. mori* svilca bolja su od mehaničkih svojstava ostalih biomaterijala te ispunjavaju zahtjeve postavljene za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Zbog β -ploča koje sadrži, svila pokazuje čvrstoću i žilavost te visoku elastičnost. Istraživanja pokazuju da β -ploče utječu na čvrstoću svile, a α -spirala utječe na žilavost svile. (slika 3.) Vlakna svile jača su od Kevlara, a omjer čvrstoće i gustoće svile je do deset puta veći nego kod čelika.^{12,13}



Slika 3. Schematski prikaz konformacije svile dudovog svilca (A) vlakna svile (B) prikaz jednog vlakna svile: (a) α -spirala i (b) β - ploča u vlaknu svile¹²

2.2.2.2. Biokompatibilnost

Biokompatibilnost se promatra iz dva aspekta: materijal nije toksičan za stanice i razgradnja produkta ne izaziva štetne nuspojave za organizam. Budući da svila pokazuje dobru biokompatibilnost već dugo se koristi za šavove.¹¹ No, kao i bilo koji drugi biomaterijal koji izaziva reakciju organizma na strano tijelo, neke štetne imunološke reakcije povezuju se i s proteinima svile, naročito zbog toga što ne potječu od sisavaca. Svileni šavovi u rijetkim slučajevima uzrokovali su preosjetljivost tkiva. Smatralo se da je uzrok preosjetljivosti prisutnost sericina. Daljnja istraživanja u kojima je korišten izolirani sericin i biomaterijali na bazi sericina nisu dokazala da je sericin uzrok štetnih posljedica. Posljednjih godina je ustanovljeno da je sericin biokompatibilan materijal te se smatra da su nepovoljne reakcije uzrokovane kombinacijom sericina i fibroina. Ispitana je imunogenost i antigenost nosača koji sadrže svilu. Provedena su brojna istraživanja koja pokazuju da propisno degumirani i sterilizirani svileni proizvodi imaju dobru biokompatibilnost i mogu se usporediti s ostalim biomaterijalima poput polilaktida i kolagena. Neki materijali na bazi svile dobili su odobrenje za primjenu u plastičnoj i rekonstruktivnoj kirurgiji. Unatoč obećavajućim rezultatima i dalje ostaju pitanja o dugoročnoj sigurnosti zbog svile u ljudskom tijelu te o imunološkoj reakciji kao odgovor na produkte razgradnje svile, ovisno o njihovoj veličini i morfologiji. Buduća istraživanja trebala bi dati odgovore na ova pitanja.^{4,13}

2.2.2.3. Biorazgradnja

Biorazgradnja svile proučava se na temelju gubitka mase, promjene u morfologiji i analizom produkata razgradnje *in-vitro*. Kao implantat, regenerirani fibroin svile razgrađuje se znatno brže od vlakana. Brzina razgradnje ovisi o sekundarnoj strukturi svile koja je rezultat pripreme materijala od regenerirane svile. Svila ima prednost nad ostalim biomaterijalima u nekoliko aspekata biorazgradnje. Kod sintetskih biomaterijala kao što su poliglikolidi i polilaktidi, produkti razgradnje se resorbiraju kroz metaboličke puteve, ali otpuštaju kisele nusprodukte, što je zabrinjavajuće. Takvi problemi se ne povezuju sa svilom. Osim toga, sintetskim materijalima smanjuju se mehanička svojstva u ranim fazama razgradnje. Nasuprot tome, svila zadržava čvrstoću u dužem vremenskom periodu, što je prednost, osobito u tkivnom

inženjerstvu gdje je potrebna spora razgradnja i nosivost. Unatoč svim prednostima, potrebno je provesti daljnja istraživanja koja bi omogućila bolje razumijevanje razgradnje. Nova saznanja potakla bi razvoj svile kao značajnog biorazgradljivog i bioresorbirajućeg materijala.

2.2.2.4. Prerada fibroina svile na bazi vode

Fibroin svile je topljiv u vodi kada je u obliku α -spirale te u obliku nasumičnog klupka. Topljivost se može održavati danima, čak i tjednima ovisno o temperaturi skladištenja, pH i koncentraciji otopine. Dakle, sustavi na bazi svile mogu se pripremiti koristeći vodene otopine te blage uvjete prerade kao što su sobna temperatura, neutralni pH i bez primjene visoke sile smicanja. Takvi uvjeti su povoljni za doziranje osjetljivih lijekova u svilene implantate. Blagi uvjeti pomažu i kod fotonskih ili električnih uređaja te biosenzora, koji mogu biti uključeni u sustav na bazi svile ili prevučeni svilom za poboljšanu biointegraciju *in-vivo*. Konformacijski prijelaz iz α -spirale i nasumičnog klupka u visoko stabilne β -ploče je potreban kod svilenih produkata kako bi se osigurala otpornost prema otapanju, toplinska i enzimaska razgradnja.¹³

2.2.3. Primjena svile u biomedicini

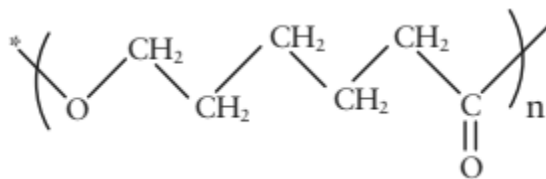
Svila ima dugu povijest primjene u biomedicini. Fibroin svile se sve više proučava za biomedicinsku primjenu zbog svoje biokompatibilnosti, izuzetnih mehaničkih svojstava i spore razgradnje (kao protein, svila je osjetljiva na proteolitičku razgradnju *in vivo* i tijekom dužeg vremenskog perioda *in vivo* polako će se apsorbirati). Osim toga, mogućnost kontrole molekulske strukture i morfologije pomoću raznih načina prerade i modifikacije površine proširila je primjenu ovog proteina u područje biomaterijala i tkivnog inženjerstva. Pokazalo se da fibroin svile u raznim oblicima (filmovi, vlakna, mreže, membrane, pređe) podržava adheziju matičnih stanica, proliferaciju i diferencijaciju *in vitro* te promiče popravak *in vivo*. Korištenjem 3D nosača fibroina svile proširena je upotreba biomaterijala na bazi svile kao obećavajućih nosača za tkiva poput kosti, ligamenata, hrskavica, kože. Svila se stoljećima koristi za šavove i najčešće je korišten prirodni materijal za šavove. Svileni konci primjenjuju se u očnoj, neuralnoj,

kardiovaskularnoj kirurgiji te za brojna druga tkiva u tijelu. Prednost svilenih šavova su čvrstoća čvorova, lako rukovanje te sposobnost da se priljube uz površinu tkiva.^{8,12}

2.3. POLIKAPROLAKTON (PCL)

Biorazgradljivi alifatski poliesteri dijele se u dvije grupe. U prvoj grupi ponavljajuća jedinica polimera je hidrokarbonska skupina, a u drugoj diol i karboksilna skupina. Poliesteri obiju grupa mogu se dobiti mikrobiološkim ili sintetskim metodama, s tim da je sintetska metoda češća i osjetljiva na biološki utjecaj. Polikaprolakton pripada grupi poliesteru s hidrokarbonskom ponavljajućom skupinom.

PCL je semikristalan polimer kojemu je temperatura staklastog prijelaza (T_g) pri -60°C , a temperatura taljenja (T_m) pri 60°C . Struktura PCL-a prikazana je na slici 4.¹⁴ Linearan je, biorazgradiv, alifatski poliestar.¹⁵ Zbog svoje dostupnosti, biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, hidrofobnosti i kompatibilnosti s biopolimerima koristi se za razne biomedicinske i farmaceutske primjene poput medicinskih šavova, materijal za tkivno inženjerstvo, dostavu lijekova itd. PCL je jedan od najprikladnijih poliesteru za upotrebu *in vivo*.¹⁶ Dobiva se polimerizacijom otvaranjem prstena ϵ -kaprolaktona, tj. anionskom polimerizacijom otvaranjem prstena. Takvoj polimerizaciji mogu se podvrći difunkcionalni monomeri koji sadrže dvije različite reaktivne skupine poput amina ili alkohola i karboksilne skupine koja je podvrgnuta reakciji ciklizacije. Da bi se te skupine polimerizirale, prethodno se jedan od prstena mora otvoriti, što se može postići dodatkom malih količina nukleofilnog reagensa kao inicijatora.



Slika 4. Struktura PCL-a¹⁴

PCL ima odobrenje za razne kliničke namjene i cito kompatibilan je s nekoliko tkiva. Izvrstan je materijal za primjenu u tkivnom inženjerstvu zahvaljujući svojim brojnim prednostima uključujući mehanička svojstva (visoka elastičnost), kemijsku stabilnost, izuzetnu biokompatibilnost i niske troškove proizvodnje. Također, široka primjena PCL-a u tkivnom inženjerstvu može se pripisati činjenici da se njegova fizikalna, kemijska i mehanička svojstva mogu lako modificirati metodama poput kopolimerizacije, miješanjem s ostalim polimerima, kemijskom modifikacijom, itd. U tkivnom inženjerstvu PCL se koristi u obliku 3D nosača, kompozita, vlakana i filmova. Općenito je pokazano da je morfologija korištenog supstrata jedan od važnijih čimbenika u kontroliranju staničnog ponašanja. No, usporedba staničnih interakcija na različitim oblicima istog biopolimera nije opsežno istražena u literaturi.¹⁷

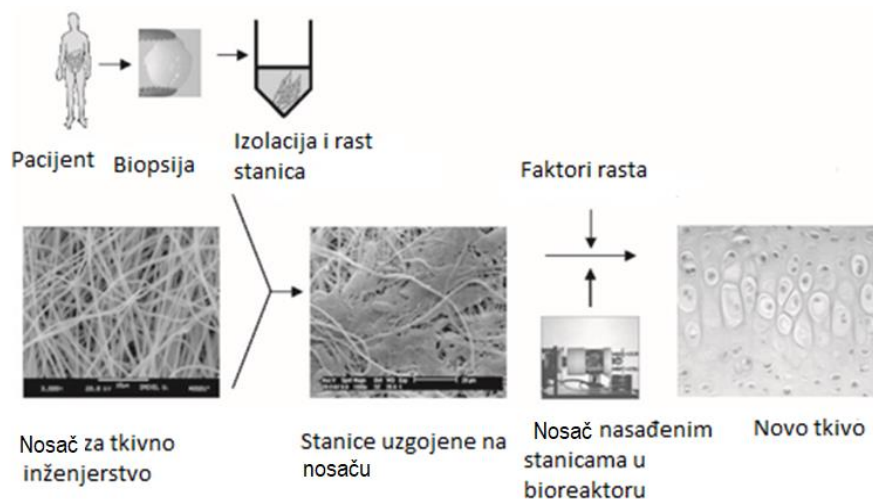
2. 4. TKIVNO INŽENJERSTVO

Tkivno inženjerstvo primjenjuje načela i metode iz područja inženjerstva i znanosti koji omogućavaju osnovno razumijevanje odnosa strukture/funkcije u normalnim i patološkim tkivima kako bi se razvili biološki nadomjesci za vraćanje, održavanje ili poboljšanje funkcija. Izniman napredak u biotehnologiji posljednjih godina, potaknuo je sve češću primjenu tkivnog inženjerstva za razvoj implantata u kirurgiji.

Autotransplantati (tkiva uzeta od pacijenta) i transplantati (tkivo uzeto od donora) se najčešće koriste kao izvori zamjenskih tkiva za liječenje mišićnog i koštanog sustava. Ključna ograničenja kod autotransplantacije su morbiditet donorskog mjesta gdje dolazi do oštećenja preostalog tkiva nakon uzimanja transplantata te ograničena količina dostupnog tkiva. Upotrebom transplantata nastoje se ublažiti navedeni problemi. Međutim, kod transplantata često dolazi do odbacivanja stranog tkiva od strane tijela domaćina zbog imunološkog odgovora na strano tkivo. Osim toga, transplantati mogu prenijeti i bolesti. Iako se temeljitim postupkom provjere eliminira većina tkiva koja mogu prenijeti bolesti, ova metoda nije 100% djelotvorna. Ograničenja konvencionalnih rekonstruktivnih materijala koji se koriste za transplantaciju, dovela su do istraživanja i razvoja tkivnog inženjerstva.

Glavni izazovi u tkivnom inženjerstvu su sinteza novih, specifičnih materijala za adheziju stanica i razvoj metoda za proizvodnju 3D sintetskih ili prirodnih biorazgradljivih polimernih nosača s

prilagođenim svojstvima. Ta svojstva uključuju poroznost, raspodjelu veličine pora, mehanička svojstva i brzinu razgradnje.¹⁸ Osim biokompatibilnosti, koja je osnovni preduvjet za svaki biomaterijal, usklađivanje vremena razgradnje s vremenom potrebnim za regeneraciju tkiva ključan je čimbenik u izradi nosača na koje se nasađuju stanice. Takvo usklađivanje može održavati mehanička svojstva i strukturni integritet projektiranog tkiva tijekom svih faza regeneracijskog procesa. Dodatno, razgradni produkti biomaterijala trebaju se sigurno metabolizirati i očistiti iz tijela. Bitno je naglasiti da ne postoji univerzalni biomaterijal koji zadovoljava zahtjeve za izradu nosača koji bi odgovarale svim tkivima. Različiti konstrukcijski problemi zahtijevaju biomaterijale specifičnih fizikalnih, mehaničkih i razgradnih svojstava.¹³ Izazove postavljene u tkivnom inženjerstvu, znanstvenici diljem svijeta pokušali su riješiti izradom 3D nosača koji imaju svojstva ekvivalentna zamijenjenom tkivu. Te umjetne 3D matrice, odnosno nosači, osiguravaju strukturni integritet sličan prirodnom izvanstaničnom matriksu u tijelu. Na nosač se nasađuju stanice uzete od normalnog tkiva pacijenta ili donora. Stanice koje se koriste mogu biti matične ili zrele, odrasle stanice. Zatim su osigurani biokemijski i/ili mehanički signali za diferencijaciju stanica u tkivo. Ti signali su uglavnom u obliku faktora rasta. U idealnom slučaju, stvorit će se tkivo, a nosač će se razgraditi, ostavljajući regenerirano tkivo. Koncept tkivnog inženjerstva prikazan je na slici 5.



Slika 5. Koncept tkivno inženjerstva¹⁸

2.4.1. Nosači za tkivno inženjerstvo

Poznato je da se biološka tkiva sastoje od dobro organiziranih vlaknastih struktura u rasponu od nanometarske do mikrometarske skale. Uspješna regeneracija tkiva i organa zahtjeva razvoj vlaknastih struktura s arhitekturom vlakana koja pridonosi taloženju stanica i staničnoj proliferaciji. U tkivnom inženjerstvu, od iznimnog je značaja stvaranje reproducibilnog i biokompatibilnog 3D nosača za rast stanica, što rezultira bio-matričnim kompozitima za popravak i zamjenu raznih tkiva. Potrebno je izraditi nosače koji imitiraju mehanička svojstva izvornog tkiva, dok osiguravaju osnovni 3D mehanički okvir na koji se stanice mogu pričvrstiti i razmnožiti se prije nego se diferenciraju u tkivo. Nosači za primjenu u tkivnom inženjerstvu trebaju imitirati mehanička svojstva i hijerarhijsku organizaciju izvanstaničnog matriksa te imati vlaknastu strukturu. Nosači koji se koriste u tkivnom inženjerstvu trebaju imati sljedeće karakteristike:

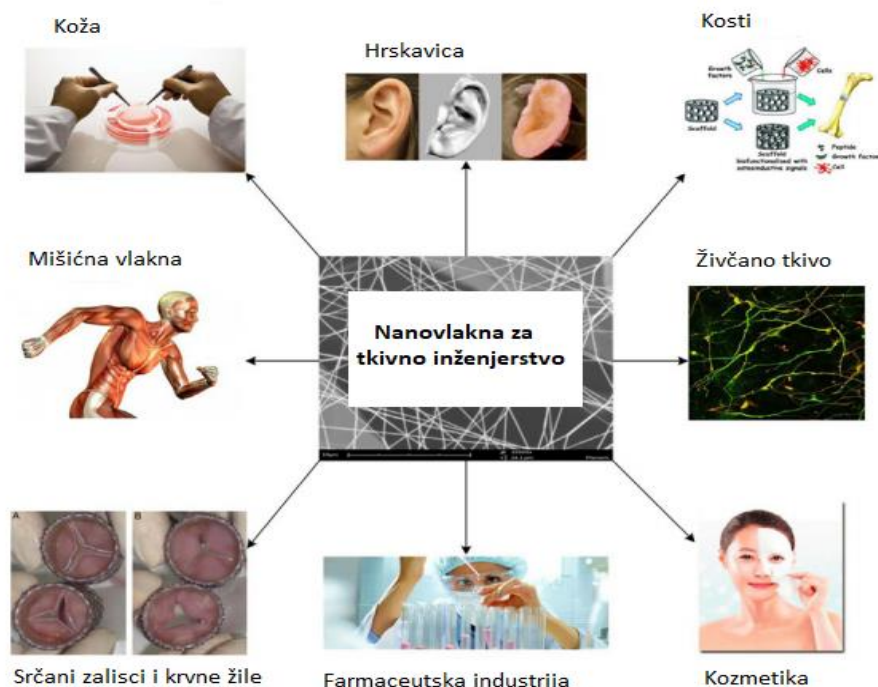
- Poroznost potrebnu za migraciju stanica
- Ravnotežu između površinske hidrofilnosti i hidrofobnosti za pričvršćivanje stanica
- Mehanička svojstva usporediva s prirodnim tkivima kako bi izdržale prirodne uvjete opterećenja
- Sposobnost razgradnje kako bi se u potpunosti resorbirale nakon implantacije
- Netoksične nusprodukte

Razvijeno je nekoliko metoda za izradu poroznih, biorazgradljivih nosača. Neke od njih su lijepljenje i pletenje vlakana, lijevanje otapala, ispiranje čestica, fazna separacija, 3D printanje, itd. Međutim, zbog jednostavnosti stvaranja nanovlakana elektroispredanje je idealna tehnika za izradu nosača.¹⁸

2.4.2. Primjena nanovlakana

Razvojem i dostupnošću mikro i nanovlakana povećana je njihova upotreba u medicini. Neki od primjera prikazani su na *slici 6*. Elektroispredeni materijali koriste se za tkivno inženjerstvo i protetiku. Maska za kožu dobiva se elektroispredanjem vlakana i koristi se za zaštitu ili liječenje rana. Elektroispredeni matovi istražuju se kao sredstva za isporuku lijekova, a

istraživanja daju obećavajuće rezultate. Biomaterijali se koriste kao dentalni implantati, zamjena za kosti, hrskavice, srčane zaliske, kozmetičke operacije i vaskularne implantate. ¹⁹



Slika 6. Shematski prikaz primjene tkivnog inženjerstva u različitim područjima ²¹

2.4.3. Regeneracija očnog tkiva

Većinu informacija ljudi dobivaju preko osjetila vida, a integritet površine oka je neophodan za dobar vid. Smatra se da teška oštećenja matičnih stanica epitela rožnice rezultiraju razornom bolešću očne površine te su mnogi znanstvenici pokušali rekonstruirati očnu površinu medicinskim i kirurškim pristupom. Koncept „očne površine“ prepoznat je u području oftalmologije, a razumijevanje uloge biologije očne površine i imunologije znatno je poboljšano brojnim istraživanjima provedenim na ovom području. Iako normalna površina oka obuhvaća samo 1/6 vanjske stjenke oka, ona podupire nekoliko glavnih funkcija oka jer je prekrivena specijaliziranim epitelom rožnice i konjunktive (očne spojnice), koji se sastoji od dva različita fenotipa epitelnih stanica. Tijekom posljednjih trideset godina, nekoliko znanstvenih otkrića poput identifikacije matičnih stanica epitela rožnice, uspostavljanje novih metoda uzgoja epitela i razumijevanje izvanstaničnog matriksa i faktora rasta omogućili su novi pristup u liječenju

poremećaja očne površine, koristeći regenerativnu medicinu. Temeljena na tkivnom inženjerstvu, regenerativna medicina je novo razvijeno područje koje koristi somatske matične stanice za stvaranje bioloških supstituta i poboljšanje funkcije tkiva. Uspjeh ovisi o tri ključna čimbenika: matičnim stanicama, izvanstaničnom matriksu i faktorima rasta. Provede se razna ispitivanja koja se temelje na primjeni matičnih stanica i prikladnih supstrata kako bi se dobili supstituti sa sposobnošću rekonstrukcije oštećenog i bolesnog tkiva.²⁰

Prirodni biopolimeri koriste se za usklađivanje i standardizaciju procesa za optimizaciju rasta i obnovu oštećenih tkiva. Biopolimeri za izradu nosača uglavnom ne izazivaju neželjene reakcije na strano tijelo i samim time imaju prednost u usporedbi sa sintetskim polimerima. Između raznih ispitanih materijala, ističe se fibroin svile koji je obećavajući materijal za izradu skela rožnice. Supstrati svile odgovorni su za razvoj materijala, adheziju, mobilnost te usklađivanje epitela i fibroblasta. Pokazuju povoljne kliničke osobine, što uključuje prilagođavanje brzine razgradnje, sposobnost mineralizacije i obradu u vodenoj okolini. Također, optička transparentnost filmova fibroina svile i stabilnost vodene otopine proteina pri neutralnom pH daju prednost svili nad sintetskim ili anorganskim materijalima. Filmovi svile imaju oblik 3D porozne strukture koja oponaša spiralnu organizaciju rožnice *in-vivo*. Kada su na te 3D strukture nasade ljudi fibroblasti, stanice pokazuju prirodnu morfologiju keratocita rožnice. Sposobnost podešavanja bioloških, kemijskih i strukturnih svojstava dovela je do znatne upotrebe sintetskih polimera u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini. Različiti sintetski polimeri imaju potencijalnu primjenu za konstrukciju trodimenzionalnih struktura kao što je skela rožnice koji se mogu podvrći staničnoj diferencijaciji, proliferaciji i migraciji. Tim polimerima pripada i polikaprolakton koji se koristi za kranijalne rekonstrukcije, izradu tankih filmova i elektroispređenih nosača, obnovu srčanog tkiva, vaskularne transplantate i regeneraciju rožnice.^{13,21} Uočeno je da nosači na bazi PCL-a imaju potencijal za povećanje ekspresije zrelih fotoreceptorskih markera.

Ključni korak za tkivno inženjerstvo je rekonstrukcija izvanstaničnog matriksa oštećenog tkiva. Karakteristike izvanstaničnog matriksa doprinose njegovoj sposobnosti reguliranja aktivnosti stanica, stoga je nužno razumjeti ulogu izvanstaničnog matriksa i to znanje upotrijebiti za razvoj umjetnog izvanstaničnog matriksa. Izvanstanični matriks je dinamički mikrookoliš koji sadrži izvanstanične makromolekule specifičnih biofizikalnih i biokemijskih svojstava koje osiguravaju

strukturnu i biokemijsku potporu okolnim stanicama. Taj okoliš stvara signale koji kontroliraju proliferaciju stanica, rast, migraciju i diferencijaciju. Izvanstanični matriks se sastoji od vode, proteina i polisaharida, no svaki izvanstanični matriks ima svoj sastav i topologiju koji se stvaraju tijekom razvitka tkiva. Za uspješnu regeneraciju tkiva mrežnice, rekonstrukcija odgovarajućeg izvanstaničnog matriksa je potrebna za pravilan i organiziran razvoj funkcionalnih stanica, *in vitro* i *in vivo*. Svaka promjenu u izvanstaničnom matriksu povezuje se s degenerativnim promjenama u mrežnici.²²

2.5. ELEKTROISPREDANJE

Elektroispredanje je stara tehnika koja se koristi od 1897. godine. Naziv "elektroispredanje", dolazi od pojma „elektrostatičko pređenje“. Ova relativno jednostavna tehnologija koristi se za stvaranje vlakana pomoću elektrostatskih sila, pri čemu se dobivaju polimerna vlakna čiji je promjer u rasponu od 2 nanometra do nekoliko mikrometara. Proces elektroispredanja je u posljednjem desetljeću privukao mnogo pažnje zbog mogućnosti ispredanja raznovrsnih polimernih vlakana (za elektroispredanje se mogu koristiti otopine prirodnih i sintetskih polimera). Osim toga, omogućuje proizvodnju vlakana u submikronskom području što je teško postići primjenom standardnih mehaničkih tehnika pređenja vlakana.

Elektroispredena vlakna se zbog manjih pora i veće površine uspješno primjenjuju u različitim područjima, kao što su nanokataliza, nosači za tkivno inženjerstvo, zaštitna odjeća, filtracija, biomedicina, farmacija, optička elektronika, zdravstvena njega, biotehnologija, inženjerstvo okoliša, itd. Ispredena vlakna imaju nekoliko prednosti, poput visokog omjera površine i volumena, podesive poroznosti, prilagodljivost raznim veličinama i oblicima te sposobnost kontrole sastava nanovlakna kako bi se postigla željena svojstva i funkcionalnost. Nedostatak kod elektroispredanja je propusnost nanovlakana koja ograničava njihovu primjenu.

2.5.1. Polimeri koji se koriste za elektroispredanje

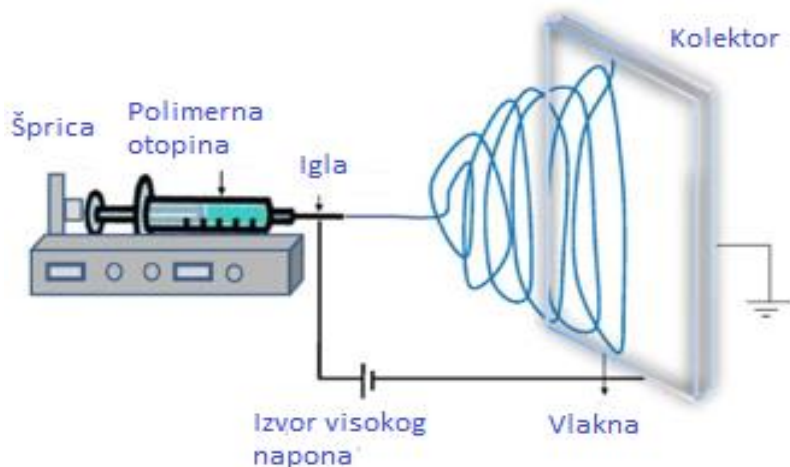
Raspon polimera koji se koriste za elektroispredanje i koji imaju sposobnost tvoriti fina nanovlakna za raznolike primjene je širok. Koriste se različiti sintetski polimeri, prirodni polimeri ili mješavina oba, uključujući proteine, nukleinske kiseline i polisaharide.

U usporedbi sa sintetskim polimerima, prirodni polimeri pokazuju bolju biokompatibilnost i nisku imunogenost u biomedicinskim primjenama. Prirodni polimeri lako vežu stanice jer sadrže specifične proteinske sekvence i to je još jedan od razloga njihovog korištenja u postupku elektroispredanja. Tipični prirodni polimeri su kolagen, kitozan, želatina, kazein, celulozni acetat, protein svile, citin, fibrinogen itd. Posljednjih godina, većinom su elektroispredani kolagen, želatina, elastin i fibroin svile. Nosači proizvedeni od prirodnih polimera obećavaju bolju kliničku funkcionalnost. Međutim, djelomična denaturacija prirodnih polimera je njihov nedostatak.

Sintetski polimeri imaju brojne prednosti jer se mogu prilagoditi tako da daju širi spektar svojstava, kao što su nužna mehanička svojstva (viskoelastičnost i čvrstoća) i poželjna brzina razgradnje. Sintetski polimeri koji se koriste u biomedicinske svrhe su hidrofobni, biorazgradljivi poliesteri, poput poliglikola (PGA), polilaktida (PLA) i polikaprolaktona (PCL).²

2.5.2. Proces elektroispredanja

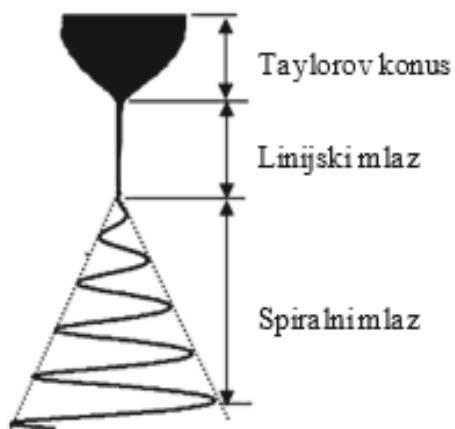
Elementi potrebni za elektroispredanje uključuju: špricu s polimernom otopinom, mlaznicu koja je povezana s izvorom visokog napona te kolektor na koji se skupljaju vlakna povezan s drugim polom električnog polja, što je prikazano na *slici 7*. Podvrgavanjem polimerne otopine električnom polju dolazi do oblikovanja kapljice koja se nabija električnim nabojem na površini. Veći intenzitet električnog polja uzrokuje deformaciju kapljice i istežanje u obliku Taylorovog konusa.²³ U trenutku kada sila električnog polja nadvlada kohezivne sile otopine, električki nabijen mlaz polimerne otopine izbacuje se iz mlaznice. Gibanjem prema kolektoru, mlaz se izdužuje pod djelovanjem elektrostatskih sila. Otapalo isparava i mlaz poprima oblik vlakana.²⁴



Slika 7. Shematski prikaz uređaja za elektroispredanje²

Četiri su faze kroz koje polimerna otopina prolazi prije formiranja vlakana, vidljivo na *slici 8*:

1. Istezanje kapljice i oblikovanje Taylorovog konusa
2. Oblikovanje linijskog mlaza – stabilna faza
3. Oblikovanje spiralnog mlaza- destabilizacija
4. Stvrdnjavanje- oblikovanje vlakana



Slika 8. Formiranje vlakna elektroispredanjem²³

2.5.3. Parametri elektroispredanja

Za uspješan proces elektroispredanja bitno je podesiti odgovarajuće parametre. U ovom slučaju parametri se dijele u tri skupine, a to su parametri polimerne otopine, procesni parametri te parametri okoline navedeni u Tablici 1. Podešavanjem tih parametara mogu se dobiti vlakna različitih promjera i morfologije.²³

Tablica 1. Parametri potrebni za postupak elektroispredanja ²⁵

Parametri polimerne otopine	Procesni parametri	Parametri okoline
Molekulska masa polimera	Električni napon	Vlaga
Koncentracija polimerne otopine	Brzina toka polimerne otopine	Temperatura
Viskoznost polimerne otopine	Udaljenost između vrha mlaznice i kolektora	
Površinska napetost		
Elektrovodljivost otopine		
Karakteristike otapala		

Molekulska masa polimera ima značajan utjecaj na reološka i električna svojstva kao što su viskoznost, površinska napetost i provodljivost. Također, utječe i na morfologiju elektroispredenih vlakana. Prilikom elektroispredanja, općenito se koriste polimerne otopine viših molekulskih masa polimera jer daju željenu viskoznost za generiranje vlakana. Uočeno je da korištenje polimernih otopina niske molekulske mase dovodi do stvaranja zrna umjesto vlakana, dok polimerne otopine visokih molekulskih masa daju vlakna većeg prosječnog promjera. Utvrđeno je da se korištenjem otopina niske koncentracije dobiva mješavina zrna i vlakana, a kako se koncentracija povećava oblik kuglice se mijenja iz sferičnog u vretenasti. Na kraju dolazi do tvorbe jednoličnih vlakana s povećanim promjerom zbog veće viskoznosti. Potrebna je optimalna koncentracija otopina za proces elektroispredanja. Budući da se pri niskim koncentracijama formiraju zrna umjesto vlakana, a pri visokim koncentracijama dolazi do nastanka debljih vlakana. Viskoznost ima značajnu ulogu u određivanju veličine vlakana i njihove morfologije. Primjenom polimerne otopine niske viskoznosti ne dolazi do stvaranja kontinuiranih vlakana, dok previsoka viskoznost uzrokuje poteškoće prilikom izbacivanja mlaza polimerne otopine, stoga je potrebno postići optimalnu viskoznost za elektroispredanje.

Viskoznost, koncentracija i molekulska masa međusobno su povezane. Površinska napetost ovisi o vrsti otapala. Općenito, visoka površinska napetost otopine usporava proces elektroispredanja zbog nestabilnosti mlaza i stvaranja raspršene kapljice. Niža površinska napetost otopine omogućava elektroispredanje pri nižem naponu. No, niža površinska napetost otapala ne znači nužno da je ono prikladnije za elektroispredanje. Provodljivost otopine određena je vrstom polimera, korištenim otapalom te prisutnošću ionizirajućih soli. Porastom električne provodljivosti otopine, dolazi do značajnog smanjenja promjera elektroispredenih nanovlakana. Niska provodljivost otopine rezultira nedovoljnim izduženjem mlaza koji je potreban za formiranje jednoličnih vlakana. Otopine visoke provodljivosti su izrazito nestabilne u prisutnosti jakog električnog polja.

Da bi došlo do stvaranja vlakana potrebno je postići odgovarajući napon. Eksperimentalno je dokazano da se oblik početne kapi mijenja sa uvjetima ispredanja (napon, viskoznost i brzina toka). U većini slučajeva viši napon uzrokuje veće istežanje otopine zbog većih Coulombovih sila u mlazu, kao i zbog jačeg električnog polja što vodi smanjenju promjera vlakana i brzom isparavanju otapala. Razina važnosti u kojoj napon utječe na promjer vlakana mijenja se ovisno o koncentraciji polimerne otopine i udaljenosti između vrha igle i kolektora. Niža brzina toka je poželjna jer otapalo u tom slučaju ima dovoljno vremena za isparavanje. Visoka brzina toka rezultira znatim vlaknima zbog nedovoljnog vremena sušenja prije dospijeca na kolektor. Potrebno je odrediti minimalnu udaljenost između vrha mlaznice i kolektora kako bi vlakna imala dovoljno vremena prije dostizanja na kolektor. Ako je udaljenost premala ili prevelika uočava se pojava zrna.²

Povećanje temperature uzrokuje brže isparavanje otapala, smanjenje viskoznosti otopine te istežanje mlaza koje uzrokuje stvaranje vlakana manjeg promjera. Povećanjem vlage dolazi do smanjenja promjera vlakana i povećanja veličine pora na površini, dok visoke vrijednosti vlage mogu izazvati i suprotan efekt.²³

2.6. DINAMIČKO MEHANIČKA SVOJSTVA

2.6.1. Dinamičko mehanička analiza (DMA)

Dinamičko mehanička analiza je tehnika koja se koristi za karakterizaciju materijala te daje informacije o viskoelastičnim svojstvima materijala. Pri zadanim frekvencijama i temperaturama, na materijalu se primjenjuje oscilirajuće naprezanje, a mjeri se rezultirajuća deformacija razvijena u materijalu. DMA se koristi za određivanje modula gubitka (E'') i modula pohrane (E'). Omjer modula gubitka i modula pohrane naziva se tangens kuta gubitka (E''/E') ili $\tan \delta$. Modul pohrane je izravno povezan sa mogućnostima materijala da skladišti energiju, a modul gubitka povezan je s raspršenjem topline. Osim toga, složeni dinamički modul, označen kao E^* , zbroj je realnog elastičnog dijela (E') i složene viskozne komponente (E''):

$$E^* = E' + iE''$$

Iz pika modula gubitka i tangensa kuta gubitka odredi se temperatura staklastog prijelaza, s tim da se pik $\tan \delta$ javlja na višoj temperaturi nego pik modula gubitka. Pik modula gubitka je uže povezan sa promjenama fizikalnih svojstava koje se pripisuju prijelazu iz staklastog u viskoelastično stanje.

Eksperimenti na DMA instrumentu mogu se izvesti pomoću različitih vrsta opterećenja, kao što su jednoosno naprezanje, kompresija, smicanje, savijanje ili torzija. Ova tehnika može se primijeniti na gotovo sve polimere, uključujući elastomere, plastomere, duromere te filmove i vlakna tih materijala. ²⁵⁻²⁷

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

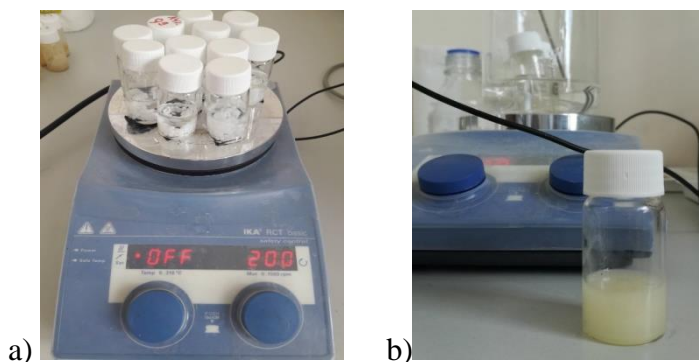
U radu je korišten polikaprolakton (PCL) proizvođača Lach-Ner, prosječne molekulske mase, $M_n=80,000$. Polimer se nalazi u granulama. Korišten je i fibroin svile (FS), proizvođača Huzhou Xintiansi Bio-tech Co, Ltd, Kina.

Kao otapala korišteni su glacijalna octena kiselina i aceton.

Za izradu kolektora korišten je polimetilmetakrilat (PMMA).

3.2. Priprema polimernih otopina

Pripremljene su četiri 18%-tne otopine PCL-a za postupak elektroispredanja. Omjer korištenih otapala, glacijalne octene kiseline i acetona iznosio je 8:2. Polimerna otopina za izradu kontrolnog uzorka sadrži zadanu količinu PCL-a i navedena otapala, dok ostale tri otopine sadrže PCL, otapala te fibroin svile u udjelima od 10%, 30% i 50 mas %. Postupak pripreme polimernih otopina sastoji se u tome da se izvagana količina PCL-a usipa u bočicu u koju se zatim dodaje određeni volumen glacijalne octene kiseline. Takva otopina stavlja se na magnetsku miješalicu, brzina mješalice iznosila je 300 o/min pri temperaturi od 40-50°C. Kada se polimer otopio dodao mu se odgovarajući volumen acetona i otopina se ponovno stavlja na miješanje, kao što je prikazano na *slici 9.a*). Prije elektroispredanja (otprilike sat vremena) u polimernu otopinu dodaje se fibroin svile i otopina se miješa do postizanja homogenosti, prikazano na *slici 9.b*).



Slika 9.) a) Polimerna otopina PCL-a na magnetskoj miješalici, b) Otopina PCL/ FS

3.3. Postupak elektroispredanja

Postupak elektroispredanja polimernih otopina PCL-a te PCL/FS proveden je na uređaju za elektroispredanje NT-ESS-300, NTSEE Co. Ltd. South Korea. Navedeni uređaj sastoji se od izvora visokog napona, pumpe, šprice s ravnim vrhom te kolektora, vidljivo na *slici 10*.

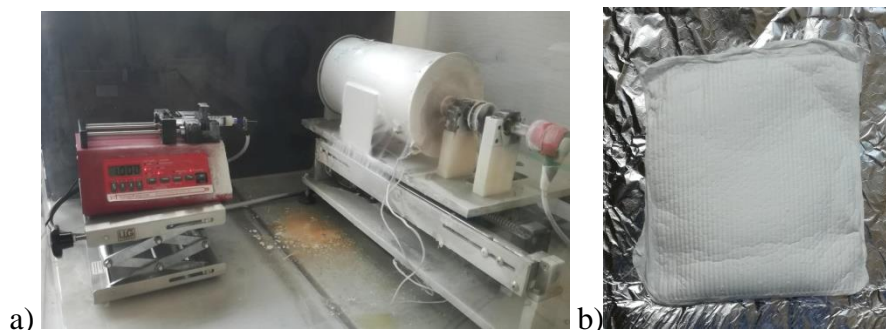


Slika 10. Uređaj za elektroispredanje NT-ESS-300, NTSEE Co. Ltd. South Korea

Uvjeti elektroispredanja koje je potrebno postaviti za uspješno elektroispredanje su:

- Električni napon: 17 kV
- Udaljenost između kolektora i vrha igle: 18 cm
- Protok polimerne otopine: 1 mL/h
- Vrijeme elektroispredanja: 4h

Šprica, proizvođača BD plastic napuni se sa po 5 mL pripremljene otopine PCL-a ili otopine PCL/FS. Na špricu se zatim stavlja igla ravnog vrha i provjerava se ima li u otopini mjehurića zraka. U slučaju da ima potrebno ih je istisnuti. Šprica s iglom stavlja se na pumpu. 3D kolektor postavljen je na udaljenosti od 18 cm od vrha igle. Na iglu se priključi izvor napona radi raspršenja polimerne otopine. Na pumpi se postavlja uvjet brzine protjecanja otopine. Postave se ostali parametri elektroispredanja kao što je električni napon i započinje elektroispredanje. Vrijeme potrebno za elektroispredanje jednog uzorka iznosi 4 sata. Nakon isteka tog vremena isključuje se izvor napona, a dobiveni uzorak se uklanja s kolektora te se spremi za daljnju karakterizaciju. Proces elektroispredanja i dobiveni uzorak prikazani su na *slikama 11. a) i b)*.



Slika 11. a) Prikaz procesa elektroispredanja, b) Uzorak dobiven elektroispredanjem

Elektroispredeni su uzorci 18% PCL te 18% PCL/FS s udjelima FS od 10%, 30% i 50%. Podaci su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Ispitivani uzorci i njihove oznake

UZORCI	PCL (g)	FS (g)
18% PCL	1,8	-
PCL/FS ₁₀	1,8	0,18
PCL/FS ₃₀	1,8	0,54
PCL/FS ₅₀	1,8	0,90

3.4. Tehnike karakterizacije

3.4.1. Dinamičko mehanička analiza (DMA)

Dinamičko mehanička analiza (DMA) provedena je na Dinamičko mehaničkom analizatoru DMA 983, proizvođač TA Instruments (*slika 12*). Mjerenjem su određene primarne viskoelastične funkcije, modula pohrane, E' , modula gubitka, E'' i tangensa kuta gubitka, $\tan\delta$. Mjerenja su provedena na frekvenciji od 1 Hz, te uz amplitudu 0,2 mm. Brzina zagrijavanja bila je 3°C/min, a temperaturno područje od -100 °C do 100 °C. Korištene su male horizontalne čeljusti za mjerenje tankih filmova. Za hlađenje na niske temperature korišten je tekući dušik.



Slika 12. Dinamičko mehanički analizator DMA 983

3.4.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Toplinska stabilnost elektroispređenih uzoraka određena je korištenjem TGA analizatora Q500 TA Instruments, New Castle, USA, prikazanog na *slici 13*.

Uzorci mase od oko 10 mg analizirani su u struji dušika (60 mL/min) uz brzinu zagrijavanja od 10°C/min, u temperaturnom području od 25°C do 600°C. Dobiveni rezultati prikazani su termogravimetrijskom krivuljom koja predstavlja promjenu mase uzorka u ovisnosti o temperaturi (TGA krivulja). Deriviranjem te krivulje dobiva se ovisnost brzine promjene mase o temperaturi (DTG krivulja).



Slika 13. Termogravimetar, Q500 TA Instruments

3.4.3. Infracrvena spektroskopija FTIR-ATR

Promjene u kemijskoj strukturi polikaprolaktona dodatkom različitih udjela fibroina svile praćene su FTIR-ATR spektroskopijom na instrumentu FTIR Spectrum One, Perkin Elmer, uz ATR komoru. Instrument je prikazan na *slici 14*. Svaki uzorak skeniran je četiri puta, a strukturna konformacijska analiza provedena je u rasponu valnih duljina od $4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ do $650\ \text{cm}^{-1}$.



Slika 14. FTIR-ATR spektrofotometar Spectrum One, Perkin Elmer

3.4.4. Mehanička svojstva materijala

Mehanička svojstva elektroispređenih uzoraka određena su na instrumentu MesdanLab Strength Tester.

Definirani početni razmak između stezaljki iznosio je 20 mm, a uzorci su istezani brzinom 20 mm/min. Provedeno je po tri mjerenja za svaki uzorak, a kao rezultat mjerenja dobivene su vrijednosti prekidne čvrstoće i prekidnog istezanja. (slika 15).



Slika 15. Mehanička kidalica MesdanLab Strength Tester

4. REZULTATI I RASPRAVA

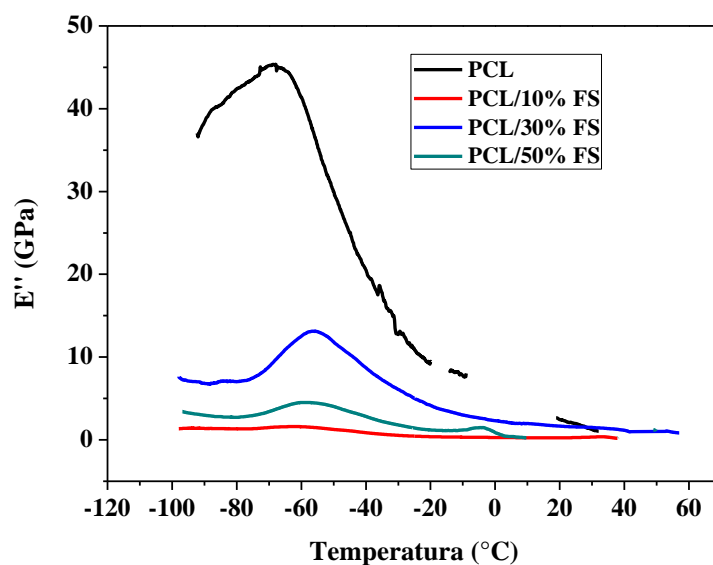
4.1. Dinamičko mehanička analiza (DMA)

Modul gubitka u ovisnosti o temperaturi (E''/T) za elektroispredeni PCL nosač te PCL/FS elektroispredene nosače s različitim udjelom FS izmjeren je na DMA instrumentu. Iz modula gubitka (E'') određena je temperatura staklastog prijelaza (T_g) elektroispredenih nosača.

Na *slici 16* prikazane su krivulje modula gubitka u ovisnosti o temperaturi za elektroispredeni PCL nosač te PCL/FS elektroispredene nosače s različitim udjelom FS, a karakteristične vrijednosti dobivene iz krivulja unesene su u tablicu 3.

Iz krivulje modula gubitka za elektroispredeni PCL nosač vidljivo je da se prijelaz iz staklastog u viskoelastično stanje odvija u temperaturnom intervalu od $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri čemu temperatura maksimuma pika modula gubitka (T_g) PCL nosača u području staklastog prijelaza, odnosno temperature staklastog prijelaza iznosi $- 68,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na *slici 16* prikazane su E''/T krivulje za elektroispredeni PCL/FS nosače s različitim udjelom FS. U tablici 3 prikazani su rezultati dobiveni DMA mjerenjem. Vidljivo je da dodatkom i povećanjem udjela FS dolazi do promjene na krivuljama modula gubitka, smanjuje se visina pika u području staklastog prijelaza i pikovi se proširuju. Budući da je visina relaksacijskog maksimuma vezana za gubitak energije u viskoelastičnom području, prema podacima iz tablice 3, može se vidjeti da s porastom udjela FS dolazi do smanjenja visine pika E'' (osim kod nosača s udjelom FS od 10%) što ukazuje na manji gubitak energije. Na osnovi vrijednosti temperature staklastog prijelaza prikazanih u tablici 3 može se zaključiti kako je porast udjela FS u elektroispredenim nosačima rezultirao porastom vrijednosti T_g u odnosu na elektroispredeni PCL nosač što potvrđuje manju pokretljivost amorfne faze PCL-a vjerojatno uslijed smještanja β -pločastih kristala iz FS u amorfnu fazu PCL-a.



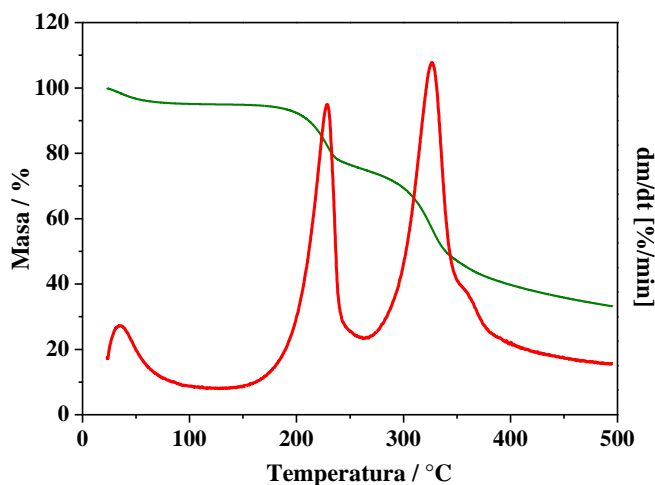
Slika. 16. Krivulje modula gubitka (E'') u ovisnosti o temperature elektroispređenih nosača PCL-a, PCL/FS₁₀, PCL/FS₃₀ i PCL/FS₅₀

Tablica 3. Rezultati dobiveni DMA analizom za elektroispređeni PCL nosač i PCL/FS elektroispređene nosače

Elektroispređeni nosači	T/°C	I _{E''} /GPa
18% PCL	-68,0	45,36
18% PCL/10% FS	-62,4	1,609
18% PCL/30% FS	-56,2	13,11
18% PCL/50% FS	-58,1	4,514

4.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)

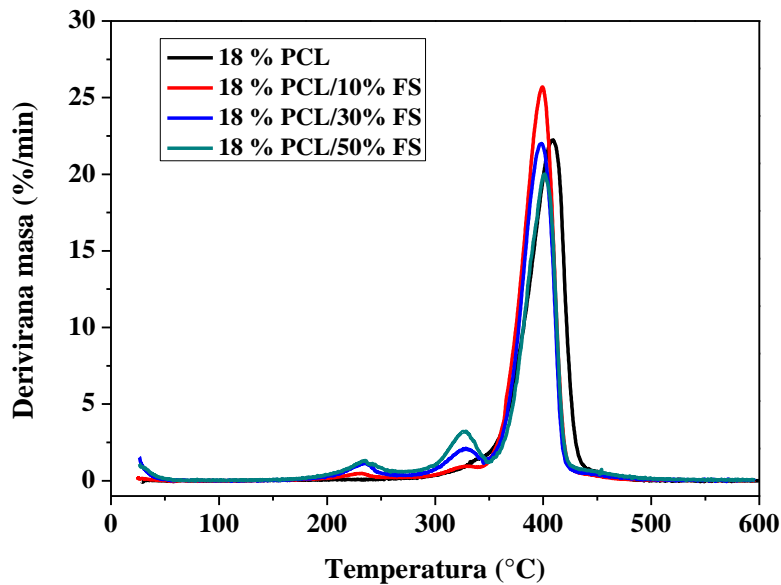
Termogravimetrijskom analizom određena je toplinska stabilnost elektroispređenih vlaknastih nosača PCL-a te PCL/FS₁₀, PCL/FS₃₀ i PCL/FS₅₀. Na *slici 17* prikazana je TG i DTG krivulja za fibroin svile (FS) dobivene u inertnoj atmosferi dušika. Fibroin svile razgrađuje se u tri stupnja razgradnje. Prvi stupanj razgradnje ispod 100 °C pripisuje se gubitku vode, dok je drugi stupanj razgradnje u temperaturnom području od 150 do 260 °C vezan za gubitak drugih hlapivih komponenata. Treći stupanj razgradnje vezan je uz raspad bočnih skupina lanca aminokiselina, kao i uz cijepanje peptidnih veza vlakana svile. Početak razgradnje fibroina svile dobiven je na 111,2 °C i pripisuje se prisutnoj vlazi. Temperaturno područje razgradnje FS je od 111,2 °C do 350,3°C uz T_{1max} 35,4°C, T_{2max} 228,7 i T_{3max} 326,4 °C. Druge hlapive komponente u FS počinju se razgrađivati nakon 150°C uz maksimalnu brzinu razgradnje na 228,7°C Gubitak mase FS počinje nakon 250°C, dok se maksimalna brzina razgradnje javlja na 326,4°C.



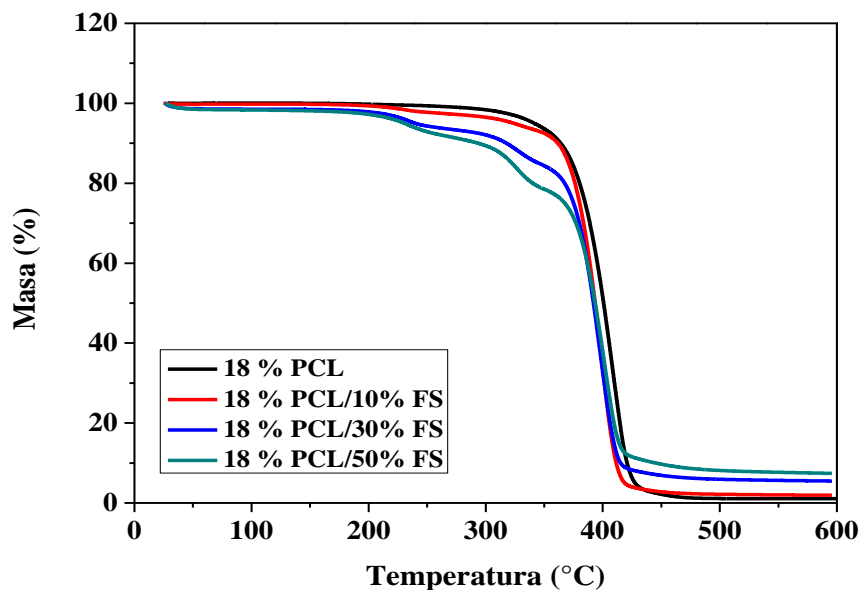
Slika. 17. TG i DTG krivulja fibroina svile

Na *slici 18* prikazane su DTG, a na *slici 19* TG krivulje PCL, PCL/FS₁₀, PCL/FS₃₀ i PCL/FS₅₀ elektroispređenih nosača. Iz dobivenih krivulja određene su temperature početka razgradnje, temperature maksimalne brzine razgradnje (T_{max}), s pripadajućim udjelom gubitka mase (Δm) te ostatak pri 600°C. Toplinska stabilnost elektroispređenog PCL nosača i PCL/FS nosača određena je na osnovi temperature kod koje dolazi do 5 % gubitka mase. Temperatura početka razgradnje

upućuje na toplinsku stabilnost ispitivanih uzoraka, a razlikuje se ovisno o dodanom udjelu fibroina svile.

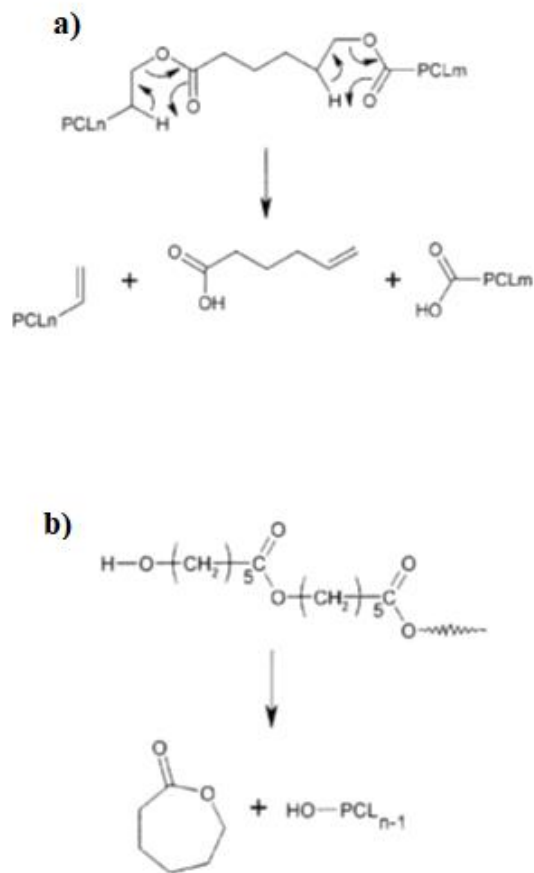


Slika. 18. DTG krivulje PCL-a, PCL/FS₁₀, PCL/FS₃₀ i PCL/FS₅₀



Slika.19. TG krivulje PCL-a, PCL/FS₁₀, PCL/FS₃₀ i PCL/FS₅₀

Iz DTG krivulje elektroispredenog PCL vlaknastog nosača vidljivo je da se razgradnja odvija u dva stupnja razgradnje s temperaturom pri maksimalnoj brzini razgradnje od 409,1°C. Početak razgradnje PCL vlaknastog nosača određen je iz TG krivulje i iznosi 340,9 ° C te je ostatak mase nakon 600 ° C 1,05 %. Prema literaturi toplinska razgradnja PCL-a odvija se u dva stupnja u prvom stupnju dolazi do nasumičnog pucanja polimernog lanca tj. do pucanja poliesterskih lanaca estera, uz otpuštanje CO₂, H₂O te nastajanje 5-heksenske kiseline (*slika 20 a*) U drugom stupnju razgradnje dolazi do pucanja kraja esterskog lanca pri čemu nastaje ε-kaprolakton (ciklički monomer) kao rezultat procesa depolimerizacije. nakon čega slijedi eliminacija monomera s hidroksilnog kraja polimera (*slika 20 b*).²⁸



Slika 20. Predloženi mehanizmi razgradnje PCL-a: a) nasumično pucanje lanca i b) cijepanje kraja lanca

Na DTG krivuljama PCL/FS elektroispredenih nosača vidljiva su tri stupnja razgradnje (*slika 18*). Prvi stupanj razgradnje vezan je za prisutnu vlagu i druge hlapive komponente u FS, u drugom stupnju dolazi do razgradnje FS te u trećem stupnju dolazi do razgradnje PCL-a. FS se počinje razgrađivati na temperaturi iznad 150°C, dok čisti PCL na 340,9°C. Iz tih vrijednosti vidljivo je da je PCL toplinski znatno stabilniji od FS-a. Povećanjem udjela FS-a dolazi do smanjenja temperature početka razgradnje PCL-a u PCL/FS elektroispredenim nosačima, odnosno do pada njegove toplinske stabilnosti. U tablici 4. prikazani su rezultati dobiveni termogravimetrijskom analizom.

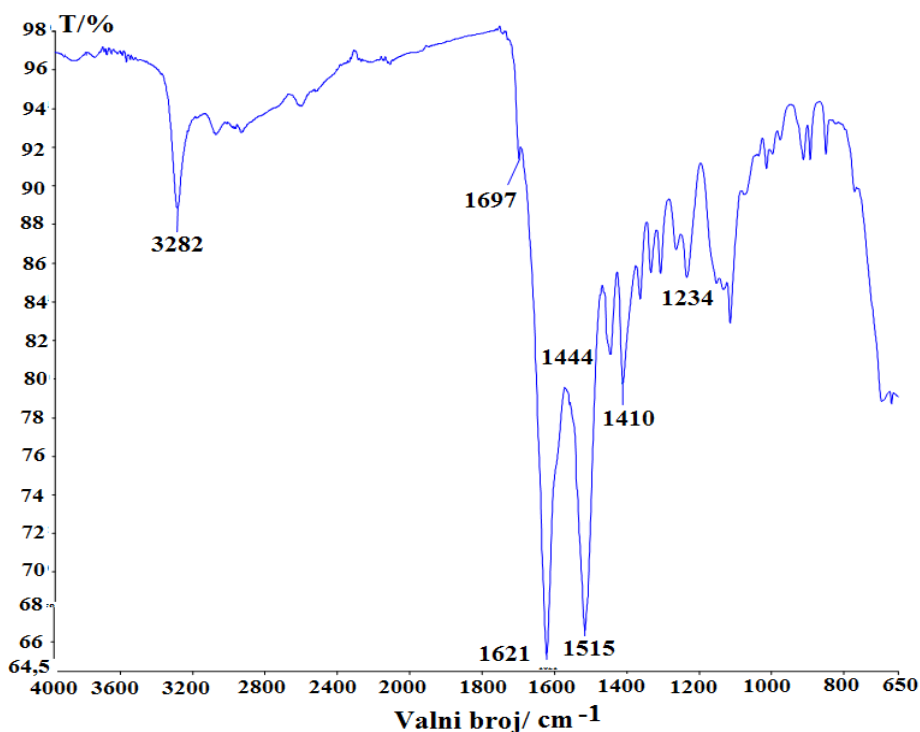
Tablica 4. Rezultati TGA analize

UZORCI	T _{5%} /°C	Δm ₁ /%	Δm ₂ /%	Δm ₃ /%	Ostatak/%	T _{1,max} /°C	T _{2,max} /°C	T _{3,max} /°C
FS	111,2	19,99	41,19	-	33,27	35,4	228,7	326,4-
18% PCL	340,9	97,58	-	97,58	1,05	-	-	409,1
PCL/FS ₁₀	322,8	1,99	3,60	91,38	1,92	232,1	329,5	399,5
PCL/FS ₃₀	238,9	4,51	8,39	78,86	5,48	234,5	328,7	398,3
PCL/FS ₅₀	228,4	6,19	11,88	70,15	7,40	233,7	324,4	399,4

Gubitak mase PCL-a iznosi 97,58%, iz čega se zaključuje da se gotovo u potpunosti razgradio, a tome u prilog ide i ostatak pri 600°C koji iznosi 1,05%, dok je ostatak kod FS 33,27% koji je vezan za karbonizirani ostatak. Porastom udjela FS u elektroispredenim nosačima, vrijednosti ostatka pri 600°C povećavaju se, iz čega se može zaključiti da FS pridonosi nepotpunoj razgradnji.

4.3. Infracrvena spektroskopija FTIR-ATR

FTIR-ATR je jednostavna i vrlo korisna tehnika kojom su određene strukturne promjene elektroispređenih uzoraka. Na *slici 21* prikazan je FTIR-ATR spektar fibroina svile. Struktura fibroina svile sastoji se od svile I, svile II i svile III. Svila I je fibroin u prirodnom stanju, svila II je fibroin u ispređenoj svili. Svila III se općenito formira na granici faza u otopinama fibroina. Također, postoje i tri sekundarne strukture fibroina: nasumična struktura, α -struktura koja se javlja kada nije prisutno smicanje te β -struktura koja je potaknuta smicanjem ili djelovanjem otapala. Količina apsorpcije β -ploča i intenzitet pikova daju relativnu procjenu kristalnosti fibroina svile.^{29,30}

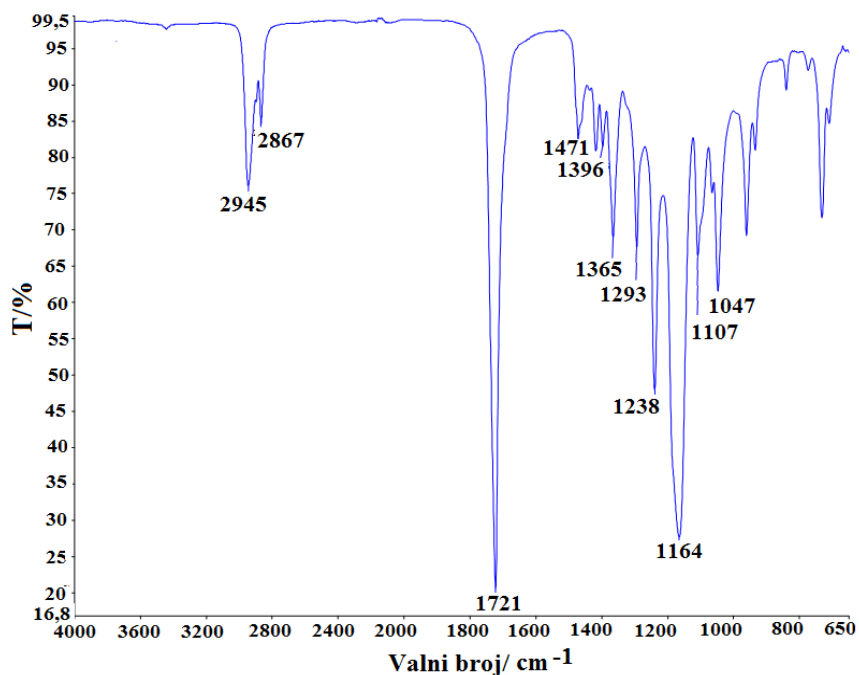


Slika 21. FTIR-ATR spektar fibroina svile

Zbog prisutnosti amidnih grupa u proteinu svile, karakteristične apsorpcijske vrpce prisutne na 1697 cm⁻¹ i 1621 cm⁻¹ pripisuju se apsorpciji peptidnog „kostura“ amida I, odnosno istezanju C=O veze u konformaciji β -pločastih nanokristala. Na 1515 cm⁻¹ nalazi se apsorpcijska vrpca karakteristična za amid II koja je vezana za istezanje C-N veze i savijanje u ravnini N-H veze u konformaciji β -pločastih nanokristala.³⁰ Apсорpcijske vrpce prisutne oko 1234 cm⁻¹ i 1444 cm⁻¹

vezane su za istezanje C-N veze u amidu III.³¹ Apsorpcijska vrpca na 1410 cm^{-1} karakteristična je za savijanje CH_2 veze. Intenzivna apsorpcijska vrpca uočena pri 3282 cm^{-1} pripisuje se savijanju N-H veze u konformaciji β -pločastih nanokristala.³⁰

FTIR-ATR spektar elektroispredenog PCL nosača prikazan je na slici 22. Apsorpcijska vrpca prisutna na 2945 cm^{-1} pripisuje se asimetričnom istezanju CH_2 skupine, dok se apsorpcijska vrpca na 2867 cm^{-1} pripisuje simetričnom istezanju CH_2 skupine.³²

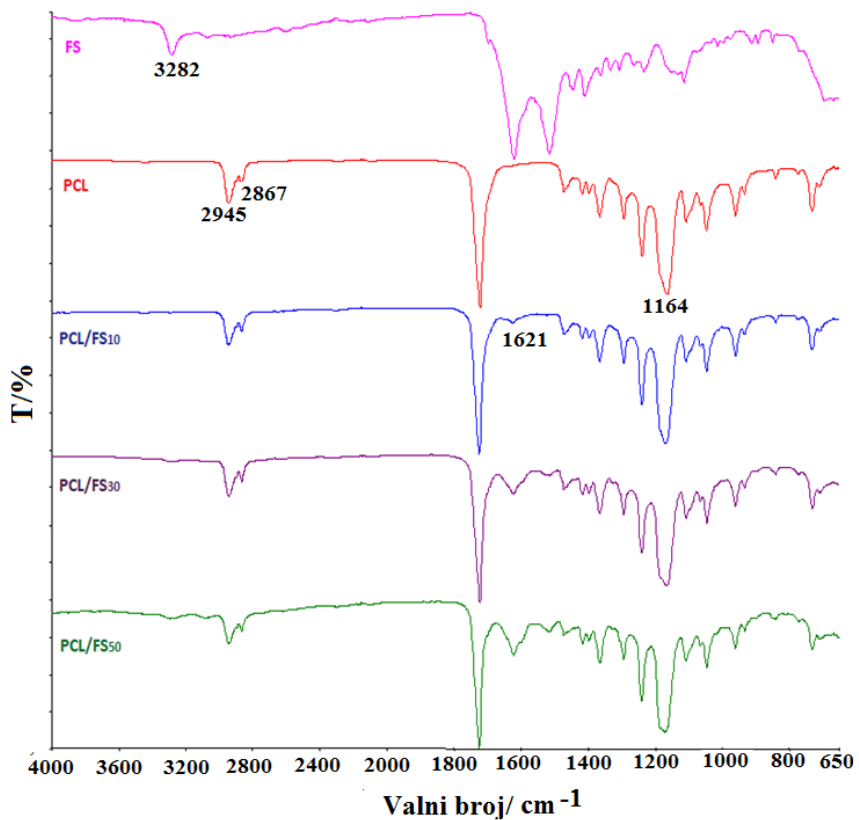


Slika 22. FTIR-ATR spektar elektroispredenog PCL nosača

Apsorpcijska vrpca prisutna na 1721 cm^{-1} vezana je za istezanje karbonilne skupine (C=O). Na 1365 cm^{-1} , 1396 cm^{-1} i 1471 cm^{-1} nalaze se vrpce vezane za savijanje CH_2 skupina. Pikovi vezani za asimetrično istezanja C-O-C skupine prisutni su na valnim duljinama od 1047 cm^{-1} , 1107 cm^{-1} i 1238 cm^{-1} . Vrpce prisutne na 1164 cm^{-1} i 1293 cm^{-1} pripisuju se istezanju C-O i C-C skupina u kristalnoj fazi.³³

Na slici 23 prikazan je FTIR-ATR spektar FS, PCL nosača i elektroispredenih nosača PCL/FS s udjelima FS od 10%, 30% i 50%. Vidljivo je da povećanje udjela FS u elektroispredenim nosačima dovodi do smanjenja intenziteta apsorpcijskih vrpca na 2945 cm^{-1} i 2867 cm^{-1} koje su vezane za asimetrično i simetrično istezanje CH_2 skupine. Također, povećanjem udjela FS dolazi

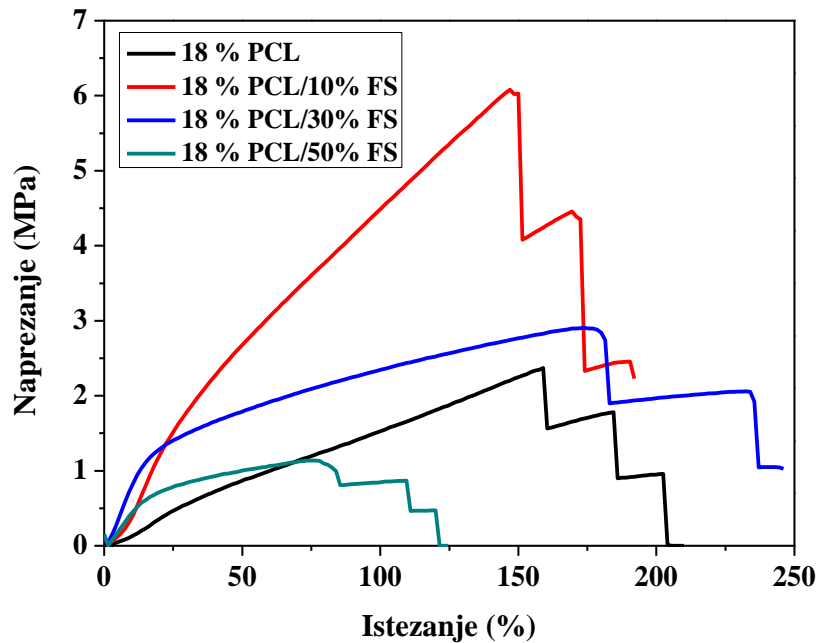
do smanjenja intenziteta apsorpcijskih vrpca na 1164 cm^{-1} koje se pripisuju istezanju C-O skupina u amorfnoj i kristalnoj fazi. Povećanje udjela FS uzrokuje povećanje intenziteta apsorpcijskih vrpca na 1621 cm^{-1} vezane uz amid I. Povećava se i intenzitet apsorpcijske vrpce na 3282 cm^{-1} vezane za savijanje N-H veze u konformaciji β -pločastih nanokristala. Ove dvije vrpce ukazuju na prisutnost FS u elektroisprednim PCL/FS nosačima.³⁰



Slika 23. FTIR-ATR spektar FS, PCL te PCL/FS₁₀, PCL/FS₃₀ i PCL/FS₅₀ elektroisprednih nosača

4.4. Mehanička svojstva

Mehanička svojstva opisuju ponašanje materijala, pod utjecajem mehaničkog naprezanja. Općenito, mehanička svojstva polimernih materijala ovise o njihovoj strukturi te o vrsti i udjelu komponenata u materijalu. Mehaničkim ispitivanjem dobivene su vrijednosti prekidne čvrstoće (σ), i prekidnog istezanja (ϵ) za elektroispredeni PCL nosač i PCL/FS nosače s različitim udjelom FS, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5, te na *slici 24*.



Slika 24. Krivulje naprezanje- istezanje za PCL, PCL/FS₁₀, PCL/FS₃₀ i PCL/FS₅₀ elektroispredene nosače

Elektroispredeni PCL nosač pokazuje malu prekidnu čvrstoću i veliko prekidno istezanje, dodatkom 10% FS dobivena je najveća prekidna čvrstoća, daljnjim povećanjem udjela FS dolazi do pada prekidne čvrstoće i najveći pad dobiven je dodatkom 50% FS. Ovakvo ponašanje može se pripisati neravnomjernoj raspodjeli FS u polimernoj otopini i stvaranju aglomerata kod većih udjela FS. Aglomerati djeluju kao loša mjesta u elektroispredenom nosaču i smanjuju čvrstoću

nosača. Također je vidljivo (tablica 5) da kod udjela FS od 50% dolazi do smanjenja i prekidnog istezanja, elektroispredeni nosač *PCL/FS₅₀* gubi elastičnost i postaje krt i lako puca.

Tablica 5. Mehanička svojstva *elektroispredene nosače*

UZORCI	Prekidna čvrstoća, σ_R/Mpa	Prekidno istezanje, ϵ_R/%
18% PCL	2,67	182,00
PCL/FS ₁₀	6,73	169,00
PCL/FS ₃₀	3,12	213,00
PCL/FS ₅₀	1,25	97,50

5. ZAKLJUČAK

Postupkom elektroispredanja pripravljeni su PCL, PCL/FS₁₀, PCL/FS₃₀ i PCL/FS₅₀ vlaknasti nosači.

Na temelju rezultata dobivenih DMA analizom vidljivo je da porastom udjela FS u elektroispredanim nosačima dolazi do smanjenja visine pika E'' (osim kod nosača PCL/FS₁₀) što ukazuje na manji gubitak energije. Također, porast udjela FS uzrokuje povećanje vrijednosti T_g u odnosu na elektroispredeni PCL nosač što govori o manjoj pokretljivosti amorfne faze PCL-a uslijed smještanja β-pločastih kristala iz FS u amorfnu fazu PCL-a.

Toplinska stabilnost elektroispredanih nosača određena je TGA analizom. Dobiveni rezultati pokazuju da se porastom udjela FS toplinska stabilnost elektroispredanih nosača smanjuje.

FTIR-ATR tehnikom određene su strukturne promjene elektroispredanih nosača. Porast udjela FS uzrokuje povećanje intenziteta apsorpcijskih vrpca na 1621cm⁻¹ vezanih uz amid I te apsorpcijskih vrpca na 3282cm⁻¹ vezanih uz savijanje N-H veze u konformaciji β-pločastih nanokristala što ukazuje na prisutnost FS u elektroispredanim PCL/FS nosačima.

Rezultati dobiveni mjerenjem mehaničkih svojstava pokazuju da se prekidna čvrstoća smanjuje porastom udjela FS što se pripisuje neravnomjernoj raspodjeli FS u polimernoj otopini i stvaranju aglomerata kod većih udjela FS.

6. LITERATURA

1. Do, A-V., Khorsand B., Geary, S.M., Salem, A.K., 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications, *Adv. Healthc. Mater.*, 4 (2015) 1742-1762.
2. Bhardway, N., Kundu, S.C., Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol. Adv.*, 28 (2010) 325-347
3. Francis, R., Sakthi Kumar, D., Biomedical applications of polymeric materials and composites, Wiley-VCH, Weinheim, 2017., str.366
4. Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K., Hofmann, S., Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering, *Acta Biomater.*, 31 (2016) 1-16
5. Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., Jing, X., Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications, *J. Control. Release.*, 185 (2014) 12-21
6. Leja, K., Lewandowicz, G., Polymer biodegradation and biodegradable polymers- a review, *Pol. J. Environ. Stud.*, 19 (2010) 255-266
7. Babu, K.M., Silk production and the future of natural silk manufacture, u Kozlowski, R.M., Handbook of natural fibers, Woodhead Publishing Limited, 2 (2012) 3-29
8. Babu, K.M., Silk fibers, u: Kozlowski, R.M., Handbook of natural fibers, Woodhead Publishing Limited, 1 (2012) 146-170
9. Carraher, C.E. Jr., Carraher's polymer chemistry, CRC Press, Boca Raton, 2017., 375-377
10. Chen, F., Porter, D., Vollrath, F., Morphology and structure of silkworm cocoons, *Mater. Sci. Eng. C.*, 32 (2012) 772-778
11. Li, Z-H., Ji, S-C., Wang, Y-Z., Shen, X-C., Liang, H., Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering, *Front. Mater. Sci.*, 7 (2013) 237-247
12. Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J, Kaplan, D.L., Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, 24 (2003) 401-416.
13. Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S.C., Wang, X., Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65 (2013) 457-470.

14. Bastioli, C., Handbook of biodegradable polymers, Smithers Rarpa Technology Ltd, 2014., str. 322-323.
15. Sawdon, A.J., Peng, C-A., Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone initiated by ganciclovir (GCV) for the preparation of GCV-tagged polymeric micelles, *Molecules*, 20 (2015) 2857-2867.
16. Yao, L-H., Shao, S-X., Jiang, L., Tang, N., Wu, J-C., Ring-opening polymerisation of ϵ -caprolactone catalysed by Bronsted acids, *Chem. Pap.*, 68 (2014) 1381-1389.
17. Asadian, M., Grande, S., Onyshchenko, J., Morent, R., Declereq, H., De Geyter, N., A comparative study on pre- and post- production plasma treatments of PCL films and nanofibers for improved cell-material interactions, *Applied Surface Science*, 481 (2019) 1554-1565
18. Brown, P.J., Stevens, K., Nanofibers and nanotechnology in textiles, Woodhead Publishing, 2007., str. 22-44
19. Hiremath, N., Bhat, G., Melt blown polymeric nanofibers for medical applications- an overview, *Nanosci.Techn.*, 2 (2015) 1-9
20. Nakamuro, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Koizumi, N., Kinoshita, S., Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering, *Prog. Retin. Eye Res.*, xxx (2015) 1-20
21. Yousaf, S., keshel, S.H., Farzi, G.A., Momeni-Moghadam, M., Ahmadi, E.D., Asencio, I.O., Mozafari, M., Sefat, F., Scaffolds for corneal tissue engineering, u: Mozafari, M., Sefat, F., Atala, A., Handbook of tissue scaffolds, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 2 (2019) 649-675
22. Abedin Zahed, M., Khoder, M., Al-Kinani, A.A., Younes, H.M., Alany, R.G., Retinal cell regeneration using tissue engineered polymeric scaffolds, *Drug Discovery Today*, (2019) 1-12
23. Zdraveva, E., i Sur., Elektroispređanje-značajna tehnika 21. stoljeća, *Tekstil*, 65 (2016) 397-409
24. Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., Farson, D., Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C*, 27 (2007) 504-509.

25. Nemat-Nasser, S., Amirkhizi, A., Holzworth, K., Jia, Z., Nantasetphong, W., Song, Y., Modification and engineering of HSREP to achieve unique properties, u: Barsoum, R.G., Elastomeric polymers with high rate sensitivity, Plas, Des. Lib., (2015) 319-345.
26. Abiad, M.G., Campanella, O.H., Carvajal, M.T., Assessment of thermal transitions by dynamic mechanical analysis (DMA) using a novel disposable powder holder, *Pharmaceutics*, 2 (2010) 78-90
27. Bergstrom, J., *Mechanics of solid polymers*, Elsevier, 2015., str. 45-49
28. Persenaire O., Alexandre M., Degee P., Dubis P., Mechanism and Kinetics of Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone), *Biomacromolecule* 2 (2001) 288-294
29. Kamalha, E., Zheng, Y., Zeng, Y., Analysis of the secondary crystalline structure of regenerated Bombyx mori fibroin, *BioSciences*, 7 (2013) 76-83
30. Kamalha, E., Zheng, Y., Zeng, Y., Fredrick, M.E., FTIR and WAXD study of regenerated silk fibroin, *Adv. Mater. Res.*, 677 (2013) 211-215
31. Zhang, H., Li, L, Dai, F., Zhang, H., Ni, B., Yang, X., Wu, Y., Preparation and characterization of silk fibroin as a biomaterial with potential for drug delivery, *J.Trans.Med.*, 10 (2012) 1-11
32. Doustgani, A., Vasheghani-Farahani, E., Soleimani, M., Hashemi-Najafabadi, S., Physical and chemical investigation of polycaprolactone, nanohydroxyapatite and poly(vinyl alcohol) nanocomposite scaffolds, *Int.J.Mater.Met.Eng.*, 6(2012)172-175
33. Abdelrazek, E.M., Hezma, A.M., El-khodary, A., Elzayat, A.M., Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend, *Egypt.J.Basic.Appl.Sci.*, (2015)

7. ŽIVOTOPIS

Ela Milčić, [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje započela u Osnovnoj školi Ivanska, Područna škola Narta. Srednju medicinsku školu Bjelovar pohađa od 2007-2011.godine u Bjelovaru, smjer farmaceutski tehničar. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologiju u Zagrebu upisuje 2012. godine na studiju Kemija i inženjerstvo materijala. Stručnu praksu odrađuje u Dukat d.o.o. u Bjelovaru, pod vodstvom Sanje Posavec. Preddiplomski studij završava 2017.g. obranom završnog rada na temu *Polimerni kompoziti kao ambalažni materijali* pod mentorstvom prof.dr.sc. Emi Govorčin Bajsić, izrađnim na Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju. Iste godine upisuje diplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemija i inženjerstvo materijala. Na diplomskom studiju sudjeluje na Shimadzu seminaru “Shimadzu Lab4You with LabSolutions Software”.